PROGENIE MOLECULAR

CE

RealCycler®

Progenie molecular
Artes y Oficios 37. Valencia 46021. España. Tel. 902 91 05 05 Fax 902 91 05 06
www.progenie-molecular.com

AMPC-G v.1

1 Uso previsto

RealCycler AMPC-G es un kit de reactivos que permite la detección cualitativa por PCR a tiempo real del ADN de de las siguientes ampC plasmídicas: ACC, EBC, CIT y DHA en muestras clínicas. El sistema incluye un control interno de amplificación para prevenir los falsos negativos debidos a la inhibición de la reacción.

2 Especificaciones

- Sensibilidad: 100 copias/µL ACC, 500 copias/µL EBC, 10 copias/µL CIT y 1 copias/µL DHA**.**
- Especificidad: ampC plasmídicas ACC (gen ACC), EBC (gen ACT), CIT (gen CMY) y DHA (gen DHA).

3 Estabilidad y almacenamiento

Todos los componentes del kit *RealCycler* AMPC-G deben ser almacenados a -20ºC.
El kit es estable a - 20ºC hasta la fecha de caducidad (ver etiqueta externa del kit).

4 Descripción del método

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está basada en la amplificación de una región específica del genoma del patógeno usando primers y sondas específicos. En la PCR a tiempo real se utilizan sondas marcadas con fluorocromos. Hay una emisión de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra. El *Cycle threshold* (Ct) es el ciclo de la PCR en el que se detecta inicialmente un aumento en la señal de fluorescencia. En la amplificación de AMPC1, ACC se detecta en FAM, EBC en TxR y el control interno en Alx532. En la amplificación de AMPC2, CIT se detecta en FAM, DHA en TxR y el control interno en Alx532.

5 Composición

RealCycler AMPC-G incluye la mezcla de reacción **Amplimix AMPC1** y **Amplimix AMPC2**, un **Control Positivo ADN ACC**, un **Control Positivo ADN EBC**, un **Control Positivo ADN CIT** y un **Control Positivo ADN DHA**. Todos los reactivos están listos para su uso sin añadir ni reconstituir ningún componente.

Componente	Viales	Número	Volumen	Conservación
AmpliMix AMPC1		1	460 µL	-15 /-25 ºC
AmpliMix AMPC2		1	460 µL	-15 /-25ºC
Control Positivo ADN ACC		1	30 µL	-15 /-25ºC
Control Positivo ADN EBC		1	30 µL	-15 /-25ºC
Control Positivo ADN CIT		1	30 µL	-15 /-25ºC
Control Positivo ADN DHA		1	30 µL	-15 /-25ºC

6 Material y equipamiento adicional requerido y no suministrado

- Equipo de PCR a tiempo real
- Kit de extracción de ADN
- Guantes desechables
- Pipetas calibradas
- Puntas de pipeta con filtro
- Congelador (-20ºC)

7 Advertencias y precauciones

- Todos los componentes del kit deben mantenerse en frío mientras se están manipulando.
- Después de añadir el ADN, minimizar el tiempo necesario para iniciar el programa de amplificación.
- Los tubos con la mezcla de amplificación no deben exponerse a la luz durante un periodo de tiempo prolongado.
- Descongelar y congelar repetidas veces los reactivos puede disminuir la sensibilidad del kit.
- Usar guantes desechables.
- Usar pipetas calibradas y puntas de pipeta con filtro.
- Los ensayos deben llevarse a cabo por personal cualificado y siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.
- No usar el kit después de la fecha de caducidad.
- Uso para diagnóstico *in vitro*.

8 Muestras clínicas

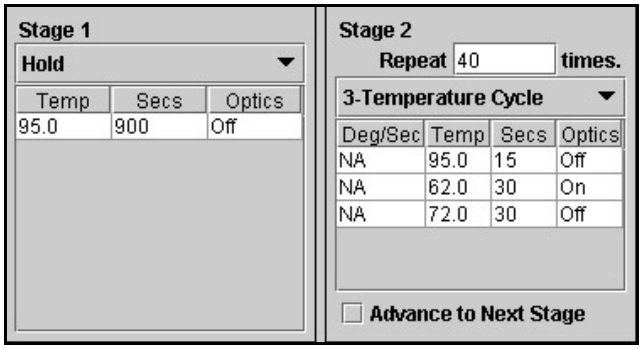
- Recoger las muestras en tubos estériles.
- Almacenarlas y transportarlas congeladas a -20ºC hasta su uso.
- Utilizar ADN bien purificado y libre de inhibidores de la PCR.

9 Procedimiento

a) Extracción de ADN

AMPC1

b) Protocolo



Selección de fluoróforos:
- FAM: detecta ACC
- TxR: detecta EBC
- Alx532: detecta el control interno.

c) Preparación de la reacción

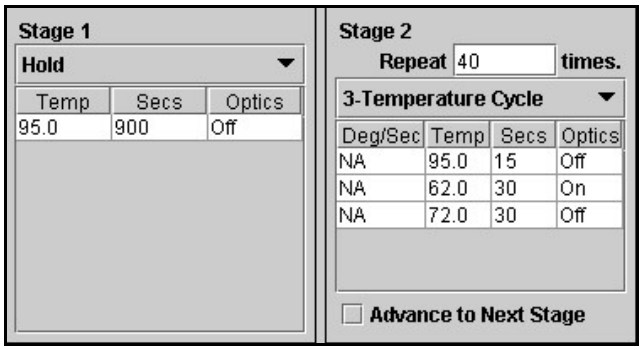
- Descongelar la **AmpliMix AMPC1** y los **Controles Positivos ADN ACC** y **EBC**.
- Tomar una alícuota de **18,75 µL** de Amplimix y añadir **6,25 µL** del ADN de cada muestra o control a cada tubo.
- Colocar los tubos en el equipo.
- Seleccionar el protocolo “AMPC-G”.
- Iniciar el programa de amplificación.

d) Interpretación de los resultados

FAM Std/Res	TxR Std/Res	Alx532 Std/Res	Interpretación
POS	ND	Indiferente	POSITIVO ACC
ND	POS	Indiferente	POSITIVO EBC
POS	POS	Indiferente	POSITIVO ACC y EBC
ND	ND	POS	NO SE DETECTA
ND	ND	ND	NO VALORABLE

AMPC2

b) Protocolo



Selección de fluoróforos:
- FAM: detecta CIT
- TxR: detecta DHA
- Alx532: detecta el control interno.

c) Preparación de la reacción

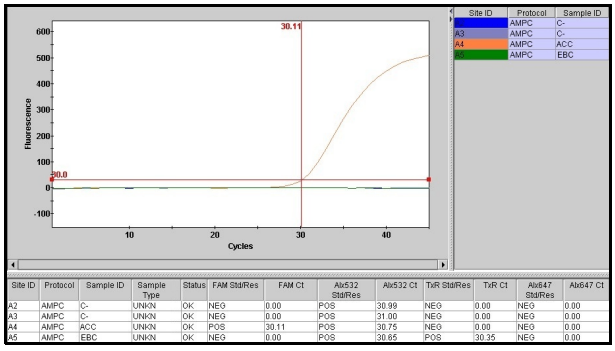
- Descongelar la **AmpliMix AMPC2** y los **Controles Positivos ADN CIT** y **DHA**.
- Tomar una alícuota de **18,75 µL** de Amplimix y añadir **6,25 µL** del ADN de cada muestra o control a cada tubo.
- Colocar los tubos en el equipo.
- Seleccionar el protocolo “AMPC-G”.
- Iniciar el programa de amplificación.

d) Interpretación de los resultados

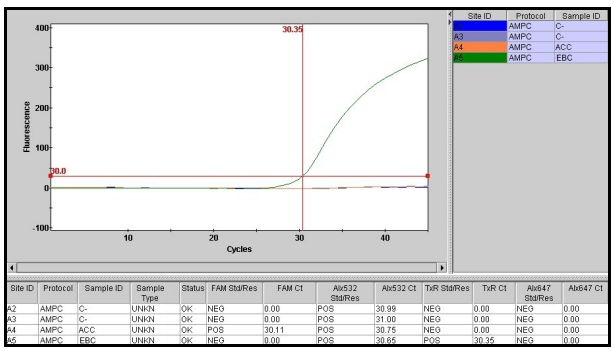
FAM Std/Res	TxR Std/Res	Alx532 Std/Res	Interpretación
POS	ND	Indiferente	POSITIVO CIT
ND	POS	Indiferente	POSITIVO DHA
POS	POS	Indiferente	POSITIVO CIT y DHA
ND	ND	POS	NO SE DETECTA
ND	ND	ND	NO VALORABLE

e) Ejemplo de resultado

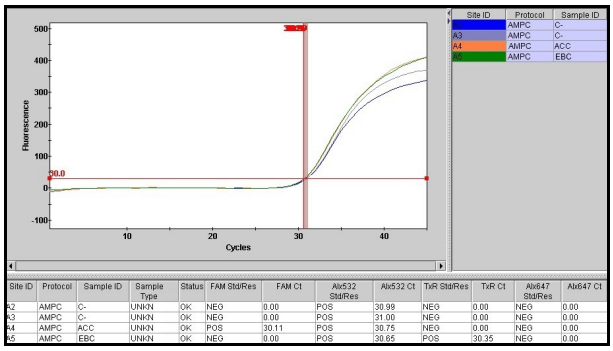
AMPC1



Gráfica 1 (Canal FAM: ACC): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos, un control positivo ACC y un control positivo EBC. Control negativo (A2 en azul): ausencia de señal. Control negativo (A3 en gris): ausencia de señal. Control positivo ACC (A4 en naranja): se observa señal con Ct=30,11. Control positivo EBC (A5 en verde): ausencia de señal.



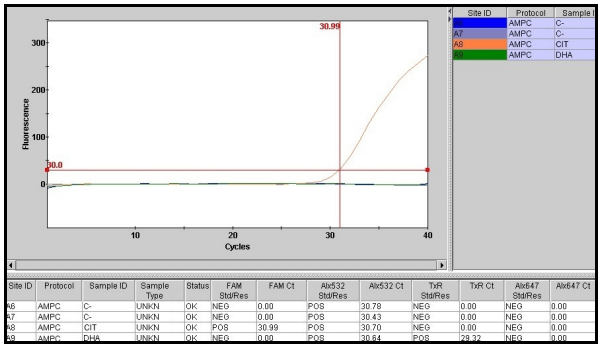
Gráfica 2 (Canal TxR: EBC): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos, un control positivo ACC y un control positivo EBC. Control negativo (A2 en azul): ausencia de señal. Control negativo (A3 en gris): ausencia de señal. Control positivo ACC (A4 en naranja): ausencia de señal. Control positivo EBC (A5 en verde): se observa señal con Ct=30,35.



Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct	Alx647 Std/Res	Alx647 Ct
A2	AMPC	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	30.99	NEG	0.00	NEG	0.00
A3	AMPC	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	31.00	NEG	0.00	NEG	0.00
A4	AMPC	ACC	UNKN	OK	POS	30.11	POS	30.75	NEG	0.00	NEG	0.00
A5	AMPC	EBC	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	30.65	POS	30.35	NEG	0.00

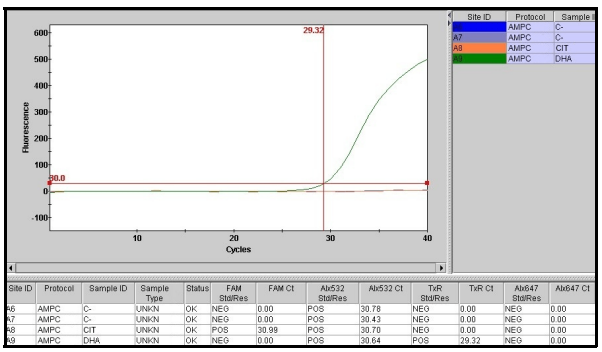
Gráfica 3 (Canal Alx532: control interno): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos, un control positivo ACC y un control positivo EBC. Control negativo (A2 en naranja): se observa señal con Ct=30,99. Control negativo (A3 en gris): se observa señal con Ct=31,00. Control positivo ACC (A4 en naranja): se observa señal con Ct=30,75. Control positivo EBC (A5 en verde): se observa señal con Ct=30,65.

AMPC2



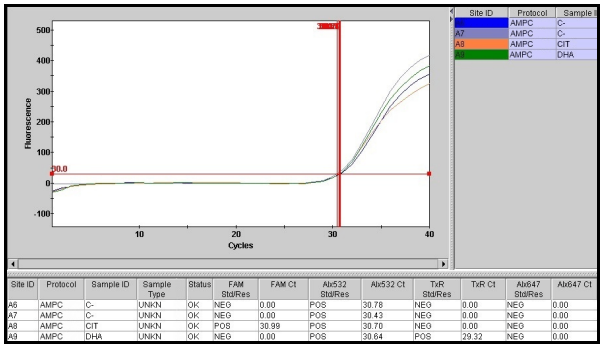
Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct	Alx647 Std/Res	Alx647 Ct
A6	AMPC	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	30.78	NEG	0.00	NEG	0.00
A7	AMPC	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	30.43	NEG	0.00	NEG	0.00
A8	AMPC	CIT	UNKN	OK	POS	30.99	POS	30.70	NEG	0.00	NEG	0.00
A9	AMPC	DHA	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	30.64	POS	29.32	NEG	0.00

Gráfica 1 (Canal FAM: CIT): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos, un control positivo CIT y un control positivo DHA. Control negativo (A6 en azul): ausencia de señal. Control negativo (A7 en gris): ausencia de señal. Control positivo CIT (A8 en naranja): se observa señal con Ct=30,99. Control positivo DHA (A9 en verde): ausencia de señal.



Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct	Alx647 Std/Res	Alx647 Ct
A6	AMPC	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	30.78	NEG	0.00	NEG	0.00
A7	AMPC	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	30.43	NEG	0.00	NEG	0.00
A8	AMPC	CIT	UNKN	OK	POS	30.99	POS	30.70	NEG	0.00	NEG	0.00
A9	AMPC	DHA	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	30.64	POS	29.32	NEG	0.00

Gráfica 2 (Canal TxR: DHA): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos, un control positivo CIT y un control positivo DHA. Control negativo (A6 en azul): ausencia de señal. Control negativo (A7 en gris): ausencia de señal. Control positivo CIT (A8 en naranja): ausencia de señal. Control positivo DHA (A9 en verde): se observa señal con Ct=29,32.



Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct	Alx647 Std/Res	Alx647 Ct
A6	AMPC	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	30.78	NEG	0.00	NEG	0.00
A7	AMPC	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	30.43	NEG	0.00	NEG	0.00
A8	AMPC	CIT	UNKN	OK	POS	30.99	POS	30.70	NEG	0.00	NEG	0.00
A9	AMPC	DHA	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	30.64	POS	29.32	NEG	0.00

Gráfica 3 (Canal Alx532: control interno): Resultado obtenido al amplificar dos controles negativos, un control positivo CIT y un control positivo DHA. Control negativo (A6 en azul): se observa señal con Ct=30,78. Control negativo (A7 en gris): se observa señal con Ct=30,43. Control positivo CIT (A8 en naranja): se observa señal con Ct=30,70. Control positivo DHA (A9 en verde): se observa señal con Ct=30,64.

10 Control de calidad

Se recomienda que se lleven a cabo controles positivos y negativos cada vez que se realice un análisis.
Cada lote del kit *RealCycler* AMPC-G ha sido testado según las especificaciones de la PCR a tiempo real utilizando el equipo *SmartCycler*® (*Cepheid*®).

11 Observaciones

Tabla de compatibilidad de fluoróforos.

Fluoróforo	Fluoróforo alternativo
FAM	
TET	CAL Fluor Gold 540
HEX	JOE, VIC, CAL Fluor Orange 560, Alexa 532
Texas Red	ROX, LC Red 610, CAL Fluor Red 610

Fecha de publicación: Marzo 2012.